Stérilisation : synthèse des normes ayant trait aux indicateurs biologiques

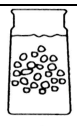
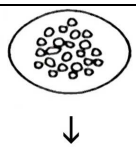
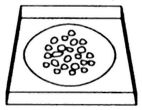
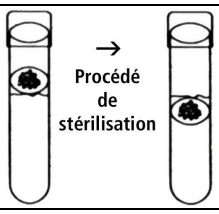
R Recommandation

I. Définitions et Exigences

Indicateurs biologiques : système d'essai contenant des micro-organismes viables, garantissant une résistance définie à un procédé de stérilisation spécifié[5]
Ils permettent d'évaluer directement la létalité microbienne d'un procédé de stérilisation. Lorsqu'ils sont utilisés en parallèle de dispositifs de surveillance du procédé physique et/ou chimique, ils peuvent fournir une indication de l'efficacité d'un procédé de stérilisation donné[1]
Les deux principales caractéristiques d'un indicateur biologique sont la population nominale des micro-organismes et la résistance de l'indicateur biologique au procédé de stérilisation, exprimée comme la valeur de D[1]

Organismes d'essai : micro-organismes, traditionnellement des spores bactériennes généralement dérivées des espèces *Bacillus et Geobacillus.*
Suspension : organismes d'essai viables en suspension dans un fluide.
Porte-germe inoculé : support dans ou sur lequel a été déposé un nombre défini d'organismes d'essai viables.
Indicateur biologique autonome : indicateur biologique présenté de telle manière que l'emballage destiné à l'incubation contienne le milieu d'incubation nécessaire à la récupération des organismes d'essai.
Dispositif d'épreuve de procédé (DEP) : article conçu pour constituer une résistance définie à un procédé de stérilisation et destiné à évaluer l'efficacité du procédé[2]

Selon l'Annexe F[2] :

Terminologie	Composants	Dessin
Organisme d'essai	Micro-organismes	
Suspensions d'organismes d'essai	Micro-organismes en suspension dans un fluide	
Porte-germe inoculé	Micro-organismes inoculés sur une surface	
Indicateur biologique autonome	Porte-germes inoculé dans un emballage primaire **OU** Système prêt à l'emploi combinant un porte-germes inoculé et un milieu de culture	 

Pour le procédé de ***stérilisation à la vapeur saturée*****,** les exigences sont :
- L'organisme d'essai est le *Geobacillus stearothermophilus* et les souches sont précisées[4].
- Pour les porte-germes inoculés et les indicateurs biologiques, le dénombrement d'organismes viables ne doit pas être inférieur à 1,0 x 10^5.
- Température minimale d'exposition : au moins 5°C en dessous de la température maximale déclarée par le fabricant.
- Température maximale d'exposition : celle déclarée par le fabricant. Si aucune température maximale n'est déclarée, une température de 140°C doit être utilis ée.
- Temps d'exposition : supérieur ou égal à 30 minutes.

- La résistance doit être exprimée comme la valeur D en minutes à 121℃. La valeur D_{121} doit être supérieure ou égale à 1,5 minute[4].
- La valeur de *z* des organismes d'essai dans la suspension, sur le porte-germes inoculé ou dans l'indicateur biologique doit être déterminée dans trois conditions de température au moins, comprise entre 110 et 130℃. Ces données doivent être utilisées pour calculer la valeur de *z,* qui doit être supérieure ou égale à 6℃ [4].

Pour les procédés de ***stérilisation à l'oxyde d'éthylène,*** les exigences sont :

- Les organismes d'essai doivent être des spores de *Bacillus atrophaeus, Bacillus subtilis* et les souches sont précisées[3].
- Pour les porte-germes inoculés et les indicateurs biologiques, le dénombrement d'organismes viables ne doit pas être supérieur ou égal à $1,0 \times 10^6$.
- Température minimale d'exposition : supérieure ou égale à 55° C.
- Température maximale d'exposition : telle que déclarée par le fabricant.
- Temps d'exposition : supérieur ou égal à 6 heures.
- La résistance doit être exprimée comme la valeur de D en minutes à 54℃ et/ou à 30℃. La valeur de D doit être supérieure ou égale à 2,5 min à 54℃ et à 12,5 min à 30℃ [3].

Pour le procédé de ***stérilisation à la vapeur de peroxyde d'hydrogène,*** les exigences sont :

- L'organisme d'essai est le *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. [14]
- Température maximale d'exposition : celle déclarée par le fabricant
- Ne sont pas encore définies dans le projet de norme :
  - le dénombrement d'organismes viables, pour les porte-germes et emballage primaire,
  - la température minimale d'exposition
  - la concentration de l'agent stérilisant et le temps d'exposition
  - la résistance [14]

II. Choix et Utilisation des indicateurs

1. Sélection

Il convient que l'utilisateur choisisse son indicateur biologique en fonction du procédé de stérilisation particulier qu'il va utiliser [1]

L'utilisateur doit contrôler :

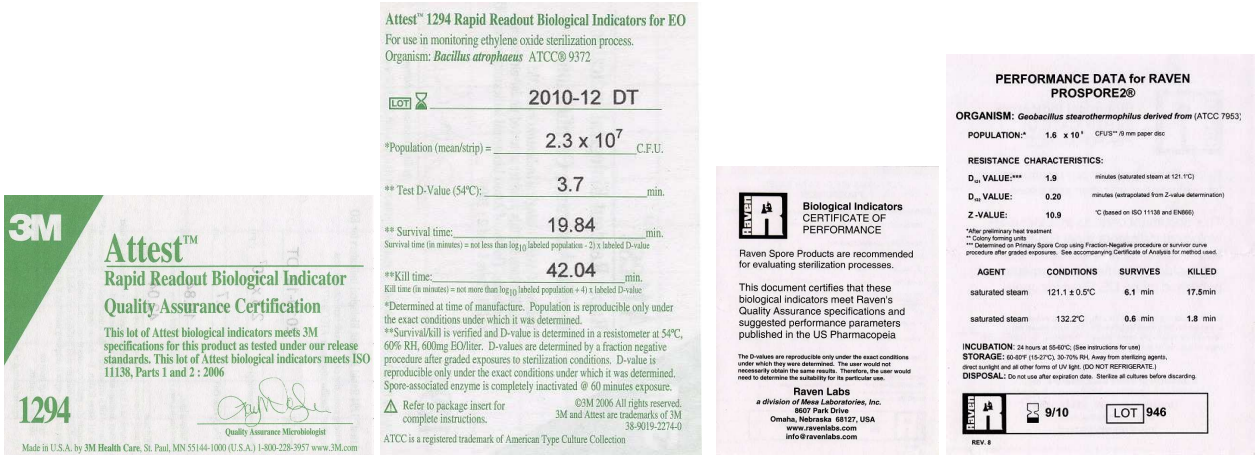
- au niveau de ***la fabrication*** que le fabricant a mis au point un système de qualité officiel et que la traçabilité des composants est assurée.
- au niveau *de* ***l'étiquetage,*** qu'il y ait :
  - un code unique pour retracer l'historique de fabrication
  - le nom de l'organisme d'essai
  - une indication du procédé de stérilisation pour lequel l'indicateur est approprié
  - la date d'expiration
  - le nom du fabricant, sur chaque unité de suspension, de chaque emballage de porte-germes et de chaque indicateur biologique.
- au niveau ***du stockage*** : les indicateurs emballés individuellement doivent être placés à l'intérieur d'un emballage secondaire pour le transport et le stockage, selon les normes sur les emballages.
- au niveau de ***la résistance*** : l'essai de résistance doit inclure la dénomination du dénombrement d'organismes viables et la détermination des caractéristiques de résistance selon l'association d'au moins deux des méthodes décrites. Au moins deux des valeurs doivent obtenues doivent figurer sur l'étiquetage[2].

2. Informations exigées pour les indicateurs biologiques[2] :

- Le nom ou l'abréviation de la collection de culture à partir de laquelle l'organisme d'essai est obtenu et le numéro de référence de la souche
- Le procédé pour lequel le produit peut être employé, la résistance, le mode opératoire et le porte germe utilisé pour déterminer la résistance
- Les conditions de stockage spécifiées
- Les instructions pour la mise au rebut
- Les instructions d'utilisation, en particulier les données concernant le milieu, l'incubation et les autres conditions à respecter pour la récupération des organismes d'essai après exposition au procédé de stérilisation

- Le nombre d'organismes d'essai par ml (suspension) ou par unité (porte germes inoculé ou indicateur biologique)
- Le nombre d'unités de produits dans l'emballage secondaire
- Une référence à la présente ISO 11138.

Le responsable de la stérilisation vérifie le certificat d'analyse et s'assure que les valeurs correspondent. *Exemple :*


3M
Attest™
Rapid Readout Biological Indicator
Quality Assurance Certification
This lot of Attest biological indicators meets 3M specifications for this product as tested under our release standards. This lot of Attest biological indicators meets ISO 11138, Parts 1 and 2 : 2006
1294
Quality Assurance Microbiologist
Made in U.S.A. by 3M Health Care, St. Paul, MN 55144-1000 (U.S.A.) 1-800-228-3957 www.3M.com
Attest™ 1294 Rapid Readout Biological Indicators for EO
For use in monitoring ethylene oxide sterilization process.
Organism: Bacillus atrophaeus ATCC® 9372
LOT 2010-12 DT
*Population (mean/strip) = 2.3 x 10^7 C.F.U.
** Test D-Value (54ºC): 3.7 min.
** Survival time: 19.84 min.
Survival time (in minutes) = not less than log10 labeled population - 2) x labeled D-value
**Kill time: 42.04 min.
Kill time (in minutes) = not more than log10 labeled population + 4) x labeled D-value
*Determined at time of manufacture. Population is reproducible only under the exact conditions under which it was determined.
**Survival/kill is verified and D-value is determined in a resistometer at 54ºC, 60% RH, 600mg EO/liter. D-values are determined by a fraction negative procedure after graded exposures to sterilization conditions. D-value is reproducible only under the exact conditions under which it was determined. Spore-associated enzyme is completely inactivated @ 60 minutes exposure.
Refer to package insert for complete instructions.
©3M 2006 All rights reserved.
3M and Attest are trademarks of 3M
38-9019-2274-0
ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection
Raven
Biological Indicators
CERTIFICATE OF PERFORMANCE
Raven Spore Products are recommended for evaluating sterilization processes.
This document certifies that these biological indicators meet Raven's Quality Assurance specifications and suggested performance parameters published in the US Pharmacopeia
The D-values are reproducible only under the exact conditions under which they were determined. The user would not necessarily obtain the same results. Therefore, the user would need to determine the suitability for its particular use.
Raven Labs
a division of Mesa Laboratories, Inc.
8607 Park Drive
Omaha, Nebraska 68127, USA
www.ravenlabs.com
info@ravenlabs.com
PERFORMANCE DATA for RAVEN PROSPORE2®
ORGANISM: Geobacillus stearothermophilus derived from (ATCC 7953)
POPULATION:* 1.6 x 10^6 CFUS** /6 mm paper disc
RESISTANCE CHARACTERISTICS:
D121 VALUE:*** 1.9 minutes (saturated steam at 121.1°C)
D132 VALUE: 0.20 minutes (extrapolated from Z-value determination)
Z-VALUE: 10.9 °C (based on ISO 11138 and EN866)
*After preliminary heat treatment
** Colony forming units
*** Determined on Primary Spore Crop using Fraction-Negative procedure or survivor curve procedure after graded exposures. See accompanying Certificate of Analysis for method used.
AGENT CONDITIONS SURVIVES KILLED
saturated steam 121.1 ± 0.5°C 6.1 min 17.5min
saturated steam 132.2°C 0.6 min 1.8 min
INCUBATION: 24 hours at 55-60°C. (See instructions for use)
STORAGE: 60-80°F (15-27°C), 30-70% RH. Away from sterilizing agents, direct sunlight and all other forms of UV light. (DO NOT REFRIGERATE.)
DISPOSAL: Do not use after expiration date. Sterilize all cultures before discarding.
Raven
9/10
LOT 946
REV. 8

3 .Utilisation

Nombre et emplacement

Pour la qualification opérationnelle des stérilisateurs à la vapeur d'eau, la notion d'indicateurs biologiques a disparu dans la nouvelle version de cette norme[11].

Pour la qualification des performances microbiologiques des stérilisateurs à l'oxyde d'éthylène [8], le point C 12 mentionne que jusqu'à 10 m^3 de volume de chambre utile, le nombre d'indicateurs biologiques est de 3 par m^3, avec un nombre minimal de 5. De 10 m^3 à 100 m^3, le nombre d'indicateurs biologiques est de 1 par m^3 supplémentaire.

Pour le contrôle de routine, le nombre d'indicateurs biologiques correspond à la moitié du nombre d'indicateurs lors de la qualification des performances microbiologique.

Dans le tableau C.3[8] - Exemples du nombre minimal recommandé d'indicateurs biologiques :

Pour un volume de chambre utile de 1 m^3, le nombre d'indicateurs biologiques est au moins égal à 5 pour la qualification microbiologique des performances. Pour le contrôle de routine, le nombre d'indicateurs biologiques minimal recommandé est de 3[8].

Dans l'Annexe F[10] : essai de type des performances, il est indiqué de placer pour chaque cycle, 4 DEP dans la chambre du stérilisateur, de les retirer en fin de cycle et de les soumettre aux modes opératoires de culture spécifiés par le fabricant et de soumettre **un support inoculé non exposé** provenant du même lot que celui utilisé pour l'essai, aux modes opératoires spécifié par le fabricant. Répéter l'essai 2 fois de plus.

Pour la validation des stérilisateurs à la vapeur de peroxyde d'hydrogène, les normes ne sont pas encore définies[14]. Veuillez vous référer au manuel de ce type de stérilisateur.

Manipulation

Il convient de suivre les directives du fournisseur pour ce qui concerne la manipulation de l'indicateur biologique suite à la stérilisation. En règle générale, les indicateurs biologiques sont retirés de la charge sans compromettre la sécurité du personnel et dans un délai spécifié validé[1]

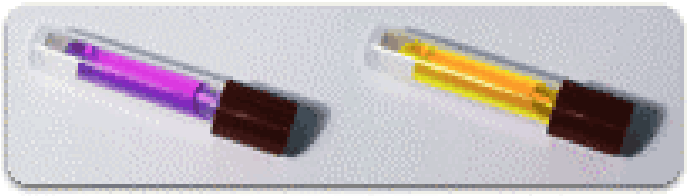
Incubation

La période d'incubation requise peut varier en fonction de la nature de l'indicateur biologique et du procédé de stérilisation[1]. Une période d'incubation de sept jours est recommandée pour les indicateurs biologiques destinés à des procédés établis[2]. A cet égard, il convient de consulter l'étiquetage de l'indicateur biologique et les informations supplémentaires fournies par le fabricant. Celui-ci doit fournir les informations relatives aux conditions de culture (c'est-à-dire la température d'incubation, le temps d'incubation et le choix du milieu de croissance[1].

En règle générale, les indicateurs biologiques des *Geobacillus stearothermophilus* peuvent être incubés à des températures comprises entre 55°C et 60°C. Le s indicateurs biologiques des *Bacillus atrophaeus* et des

Bacillus subtilis peuvent être incubés à des températures comprises entre 30°C et 39°C, conformément aux spécifications fournies par le fabricant[1].
Exemple : Indicateur Attest®

- *retrait des indicateurs du paquet test*
- *vérifier l'indicateur chimique sur le paquet de l'indicateur biologique*
- *porter des lunettes de sécurité et appuyer sur le capuchon*
- *briser l'ampoule de verre dans le compartiment de l'incubateur réservé à cet effet*
- *tenir l'indicateur biologique par le capuchon et tapoter sur le tube jusqu'à ce que le milieu de culture imprègne la bandelette au fond du tube, puis incuber*
- *écraser, tapoter et mettre en incubation au moins **un indicateur biologique non stérilisé** chaque jour où un indicateur stérilisé est mis en incubation et à chaque étalonnage du lecteur automatique.*



Exposé et conforme

Non exposé

Il existe des indicateurs biologiques à incubation rapide.

III. Paramètres de tolérance et Interprétation des résultats

Les fabricants doivent fournir des informations écrites concernant l'interprétation des résultats obtenus et les instructions d'incubation.
Il convient que pour un procédé de stérilisation validé dans lequel tous les paramètres préétablis ont été satisfaits, on **constate une croissance nulle** de l'indicateur biologique.
Tout résultat d'essai présentant une croissance de l'indicateur alors qu'aucune n'est attendue, peut constituer une indication de procédé non valide, d'indicateur défectueux ou d'un système d'essai défaillant et devrait conduire à une enquête afin de déterminer la cause du résultat positif.
Les actions à entreprendre peuvent impliquer la mise au rebut du lot de produit en tant que lot non stérile[1].
Résultat attendu : **absence de prolifération**, après incubation de l'organisme d'essai dans l'un quelconque des indicateurs de stérilisation à l'oxyde d'éthylène qui ont été traités.
Résultat non conforme si toute culture d'un indicateur biologique révèle une prolifération de l'organisme d'essai. Il convient d'interdire l'utilisation de la charge[11].

IV. Surveillance et contrôles de routine

Si des indicateurs doivent être utilisés pour **la mise à disposition du produit**, les enregistrements des paramètres du procédé de stérilisation physique et les résultats des essais des indicateurs sont revus afin de démontrer que le procédé de stérilisation a bien été effectué[7].
Lorsque des indicateurs biologiques sont utilisés pour **la surveillance de routine**, il convient de les positionner aux emplacements identifiés comme les moins accessibles pour la stérilisation lors de la validation et doivent être considérés comme **faisant partie des critères de libération** et qui s'ajoutent au mesurage des paramètres de procédé[5].
Les données utilisées pour valider le procédé de stérilisation fournissent au moins la valeur définie pour un détecteur d'air et/ou l'interprétation d'un indicateur biologique utilisé seul ou avec un DEP.
Lorsque des indicateurs biologiques sont utilisés pendant la requalification, il convient que leurs performances présentent une épreuve similaire à celles des indicateurs utilisés pendant la validation[7].

Vapeur d'eau :
Les indicateurs biologiques doivent être utilisés 1x/an lors de la validation[13]
Pour les stérilisateurs à la vapeur d'eau non validés/validables, un indicateur biologique doit être utilisé dans chaque charge[12].

Oxyde d'éthylène
Le conducteur de stérilisation, **pour chaque charge** est tenu de déposer au moins un indicateur biologique selon FD S98-135 (avril 2005).

Peroxyde d'hydrogène
Le conducteur de stérilisation, **pour chaque charge** est tenu de déposer au moins un indicateur biologique selon les recommandations françaises. (ndlr : En Suisse, cela dépend des modèles et des équipements à disposition permettant ou non une libération paramétrique)

V. Divers

Stockage et manipulation

Il convient de suivre les recommandations du fournisseur en ce qui concerne le stockage et la manipulation des indicateurs biologiques. Le non respect de ces recommandations pourrait affecter l'intégrité et la performance de l'indicateur.
En général, il convient de conserver les indicateurs biologiques dans leur emballage de protection jusqu'à leur utilisation.
Lors du stockage, il convient d'accorder une attention toute particulière à la température, l'humidité relative, les influences chimiques et la lumière. Ils peuvent généralement être stockés à température ambiante. Attention aux dates de péremption[1].
Exemple : « Conserver dans un endroit entre 2°C et 25°C. S'a ssurer que l'indicateur biologique est à température ambiante avant son utilisation. Garder à distance de tout système de stérilisation, de source d'oxyde d'éthylène, de peroxyde d'hydrogène, d'acide, de base ou de toute substance antimicrobienne, volatile, des cassettes Sterrad. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption indiquée. » (Mode d'emploi Sterrad CycleSure 24 biological indicator)

Formation
Le personnel chargé de la mise en place, du retrait, des essais et de toute manipulation des indicateurs biologiques doit avoir suivi les formations nécessaires. Il convient que cette formation soit documentée et que l'on vérifie régulièrement qu'elle reste adaptée. Il est recommandé de disposer de procédures écrites pour l'essai et la manipulation des indicateurs biologiques[1].

Mise au rebut
Les indicateurs biologiques composés de micro-organismes non dangereux peuvent être manipulés sans restriction aucune et il convient que leur expédition et leur transport respectent les règles internationales en matière de transport de micro-organismes non dangereux.
Les indicateurs biologiques inactivés peuvent être jetés comme des déchets ménagers, tout comme les indicateurs périmés ou inutilisés à condition que le micro-organisme ne soit pas dangereux. Cependant il convient de suivre les instructions du fabricant pour la mise au rebut, qui requiert le plus souvent une stérilisation préalable[1].
Exemple : Avant de jeter tout test positif ou ayant dépassé la date de péremption, stériliser à la vapeur à 121°C pendant au moins 30 minutes ou par tout autre procédé de stérilisation en vigueur (Prospectus de ProSpore2).

ANNEXE 1 : Exemples d'indicateurs biologiques

<table>
<tr><td>Vapeur
</td><td>Vapeur
</td></tr>
<tr><td>Oxyde d'éthylène
</td><td>Oxyde d'éthylène
</td></tr>
<tr><td>Peroxyde d'hydrogène
 </td><td>Peroxyde d'hydrogène
 </td></tr>
</table>

BIBLIOGRAPHIE

1. **ISO/DIS 14161 (2008)** Stérilisation des produits de santé – Indicateurs biologiques – Directives générales pour la sélection, l'utilisation et l'interprétation des résultats
2. **ISO 11138-1 (2006)** Stérilisation des produits de santé – Indicateurs biologiques – Partie 1 : Exigences générales
3. **ISO 11138-2 (2006)** Stérilisation des produits de santé – Indicateurs biologiques - Partie 2: Indicateurs biologiques pour la stérilisation à l'oxyde d'éthylène
4. **ISO 11138-3 (2006)** Stérilisation des produits de santé – Indicateurs biologiques – Partie 3 – Indicateurs biologiques pour la stérilisation à la chaleur humide
5. **ISO TC 17665-1 (2006)** Stérilisation des produits de santé – Chaleur humide – Patrie 1 : Exigences pour le développement, la validation et le contrôle de routine d'un procédé de stérilisation des dispositifs médicaux
6. **ISO DTR 17665-2 (2009)** Stérilisation des produits de santé – Chaleur humide – Patrie 2 : Directives relatives à l'application de l'ISO 17665-1
7. **ISO 14937 (2000)** – Exigences générales pour la caractérisation d'un agent stérilisant et pour le développement, la validation et la vérification de routine d'un processus de stérilisation pour dispositifs médicaux
8. **ISO 11135-1 (2007)** Stérilisation des produits de santé - Oxyde d'éthylène – Partie 1 : Exigences de développement, de validation et de contrôle de routine d'un processus de stérilisation pour des dispositifs médicaux
9. **ISO 11135-2 (2008)** Stérilisation des produits de santé - Oxyde d'éthylène – Partie 2 : Directives relatives à l'application de l'ISO 11135-1
10. **NF EN 1422 (1997**) Stérilisateurs à usage médical – Stérilisateurs à l'oxyde d'éthylène. Exigences et méthode d'essai
11. **EN 285+A1 (2008)** Stérilisation – Stérilisateurs à la vapeur d'eau – Grands stérilisateurs
12. **Guide pour la validation et le contrôle de routine des procédés de stérilisation à la vapeur d'eau dans les établissements de soins** - Swissmedic 2003
13. **Bonnes pratiques de retraitement des dispositifs médicaux stériles** Swissmedic **-** Edition avril 2004, actualisée en 2005
14. **ISO/CD 11138-6 (2008)** Stérilisation des produits de santé – Indicateurs biologiques – Partie 6 : Indicateurs biologiques pour la stérilisation à la vapeur de peroxyde d'hydrogène